

Original Articles

# 난담반의 인체폐암세포주 NCI-H460에 대한 세포자살유도 효능

최은아<sup>1\*</sup>, 김경희<sup>2\*</sup>, 유병철<sup>2</sup>, 유화승<sup>3\*\*</sup>

1. 대전대학교 한의과대학
2. 국립암센터 연구소
3. 대전대학교 둔산한방병원 동서암센터

## Induction of Apoptotic Cell Death by Egg white combined-Chalcanthite on NCI-H460 Human Lung Cancer Cells

EunA Choi<sup>1\*</sup>, Kyung-Hee Kim<sup>2\*</sup>, Byong-Chul Yoo<sup>2</sup>, Hwa-Seung Yoo<sup>3\*\*</sup>

1. College of Oriental Medicine, Daejeon University
2. Research Institute, National Cancer Center
3. East-West Cancer Center, Dunsan Oriental Medical Hospital, Daejeon University

Received : 09. 07. 10

Accepted : 09. 07. 27

**Key Words:**

Chalcanthite, Lung cancer, Proteome, 2-DE, MALDI-MS

**ABSTRACT**

**Background :** Anticancer effects of herbal medicine have been reported in various types of cancer, but the systematic approaches to explain molecular mechanism(s) are not established yet.

**Objective :** The purpose of this study is to investigate the apoptotic cell death by Egg White combined Chalcanthite in NCI-H460 human lung cancer cells.

**Methods :** Inhibitory effects were estimated by the MTT-assay. Cancer cells were stained with DAPI and showed condensed and fragmented nuclei. The expression of cleaved caspase-3, bcl-2, and bax was detected by western blotting. To establish a basis of understanding for anti-cancer mechanism, whole proteins have been obtained from NCI-H460 harvested at 24 hrs after the treatment of Egg White combined Chalcanthite, protein expression has been profiled by 2DE-based proteomic approach.

**Results :** NCI-H460 human lung cancer cells were treated by three samples of IS3, IS4 and IS5. IS4 inhibited most effectively the growth of NCI-H460 human lung cancer cells. The expression of cleaved caspase-3 increased in IS4 in a concentration-dependent manner. Various changes of the protein expression have been monitored, and most frequent dysregulation was found in Vimentin, Lamin-A/C.

**Conclusion :** Egg White combined-Chacanthite inhibited the growth of NCI-H460 human lung cancer cells by inducing the apoptotic cell death via caspase-3 activation. Based upon the present findings, the further study will focus on monitoring various cancer survival factors after artificial regulation of the proteins identified, and it would be the basis for the understanding of the Chacabthite anti-cancer effect(s) at the molecular level.

### I. 서론

현재 세계적으로 사용되는 항암제는 정도의 차이는 있지만 인체에 발생하는 부작용으로 인해 많은 한계점을 가지고 있으며<sup>1)</sup>, 상대적으로 부작용이 적을 것으로 예측되는 천연물을 이용한 항암제의 개발 연구가 최근 적극적으로

\*Corresponding author : Hwa-Seung Yoo, East-west Cancer Center, Dunsan Oriental Hospital of Daejeon University, 1136 Dunsan-dong, Seo-Gu, Daejeon, Rep. of Korea  
Tel:82-42-470-9132, Fax: 82-42-470-9006, E-mail: altyhs@dju.ac.kr

\* These authors contributed equally to this work.

이루어지고 있다<sup>2,3)</sup>. 특히 한약의 연구에 있어서 오랜 기간 동안 인체에 사용된 식물 기원성 한약물에서 apoptosis 유발 항암물질을 개발하는 연구는 진행되고 있지만 광물성 한약물에 대해서는 비교적 연구가 적은 편이다<sup>4)</sup>.

광물성 한약재는 중국, 한국 등에서 오랫동안 약용으로 사용되어 왔으며 『본초강목』에 264종, 『동의보감』에 144종 등이 수재되어 있다<sup>5)</sup>. 그러나 활석, 석고 등 몇몇의 경우를 제외하고는 활용도가 높지 않은데<sup>6)</sup>, 그 이유로는 광물성 한약재의 독성에 대한 막연한 두려움이나 현대 약학적으로 명확한 분석이 이루어져 있지 않은 점, 과학적이고 체계적인 연구가 부족하여 그 효능에 대해 의구심을 가지며<sup>5)</sup>, 독성을 감소하거나 제거하는 방법이 현대 의학적으로 완전히 알려지지 않은 점 등의 원인을 들 수 있다<sup>7)</sup>. 따라서 광물성 한약재는 식물성, 동물성 한약재와 마찬가지로 수 천 년 역사를 통해 전해 내려온 약물로 현대 과학적 방법으로 그 유효성분과 효능이 규명된다면 새로운 신약 개발에 일조하리라고 본다<sup>8)</sup>.

담반(膽礬)은 광물성 한약재로 황산동 Copper vitriol ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )의 천연품 Chalcanthite로 『신농본초경』에 '석담(石膽)'으로 최초로 기재되었다. 주성분으로  $\text{CuO}$ ,  $\text{SO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ 를 함유하고 있으며 미량부존성분으로 Zn, Ga, Ti, Na, Ca, Fe, Al, Mg, Si, Cr, Ni 등이 혼합되어 있다<sup>9)</sup>.

담반의 주성분인 구리는 생명체에서 필수적인 중금속의 하나로 인체 내 구리 대사 과정에 대해서 알려진 바가 많지 않다. 구리는 우선적으로 알부민에 결합하여 간으로 이동된 다음 간에서 ceruloplasmin에 흡수된 후 여러 장기로 이동되는 것으로 볼 수 있다. 장세포에서 간으로 이동되는 과정에서 알부민과 transcuprein이라는 단백질의 역할이 중요할 것으로 예상되고 있으나 이들의 정확한 기전은 아직 규명되어 있지 않다<sup>9)</sup>. 문헌상 광물성 한약재 담반  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  천연물의 간담귀경(肝膽歸經)과 현대 약학적 간으로의 구리이동기전은 상응한다. 인체동의 50-70%는 근육과 골격에 있고 약 20%가 간장에 모여 있으며 중요한 촉매제로 동은 조혈과정에 참여하고 철의 대사와 관련된다<sup>10)</sup>.  $\text{CuSO}_4$ 가 주성분인 담반을 위시한 황산염류 광물성 한약재는 생명유지의 필수 요소인 미네랄 및 황(S)과 관련되어 있기에 그 규명은 의의가 크다고 할 수 있다.

광물성 한약재인 녹반, 백반 등과 제약회사에서 의약품 제조시 첨가되는 광물성 한약재의 일종인 식염은 천연물이 아닌 순수성분을 가공한 것이 많아 잘못하여 인공합성품을 사용한다면 유효성분을 함유하고 있을 미량부존성분

의 부재로 인하여 문헌에 있는 한약재 고유의 효능에는 미치지 못할 것으로 사료된다. 천연물에서 항암제를 개발할 때 화학적으로 순수물질을 분리하여 사용하는 것과 미량부존성분(불순물) 그대로의 생약 전체를 사용하는 것은 약리적으로 다르다. 한약재의 항암제 개발연구에서 식물성, 동물성, 광물성 한약재의 천연품 또는 그 천연품의 법제품을 사용하는 것과 천연품에서 단일성분만을 추출한 순수물질을 사용하는 것은 분명한 차이가 있다고 본다. 천연물에 존재하는 주성분 외의 미량부존성분은 비록 실험실에서 의 차이는 미미하다 할지라도 인체에 투여되어 작용할 경우 효능에는 많은 영향을 끼칠 것으로 추정된다.

본 연구에서는 미량부존성분(불순물)이 함유된 천연 광물성 생약 담반을 100-160℃로 12시간 가열처리하여 얻은 고담반을 토종유정란의 난백과 혼합한 천연 합성물 난담반을 주된 실험물질로 삼았다. 이는 고 인산 김일훈 선생이 창안한 법제법으로 한의학의 특징인 약물의 법제를 통해 독성성분을 감소 내지 제거하거나 인체에 부정적인 기능을 저하시킬 수 있으며 함께 사용하면 약리작용을 도와주는 두 가지 이상의 생약의 혼합 내지 합성으로 독성의 감소 내지 제거, 약성의 강화 또는 생체 흡수율 강화 등을 도모할 것이라는 가정에 의해서 행해진 독창적 방식이다<sup>11)</sup>. 한의학 문헌적으로 담반과 효능이 유사하고 같은 황산염류인 백반은 <암류중의방치연구(癌瘤中醫方治研究)>에서 평소단(平消丹)의 중요 구성약물로 암 치료에 활용되었으나<sup>12)</sup>, 담반에 관련한 항암효능에 대해서는 아직까지 구체적인 연구가 이루어지지 않고 있는 실정이다.

본 연구에서는 담반을 가열하여 수분을 증발시킨 고담반(InSan3, IS3), 고담반을 난백과 혼합시킨 난담반(InSan4, IS4), 그리고 생담반(InSan5, IS5)의 NCI-H460 인체폐암세포에 대한 세포독성을 비교 확인하고, 이중 가장 효능이 뛰어난 난담반에 대해 세포자살 유도기전 관련 실험 및 2-DE를 통한 단백질의 발현 변화를 관찰하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 암세포 배양 (Cell culture)

폐암세포주인 NCI-H460을 L-Glutamine containing 10% FBS, 100U/ml penicillin, 100U/ml streptomycin이 함유된 RPMI1640배지에서 T75 flask로 37°

C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. NCI-H460 cell 은 한국세포주 은행에서 분양받아 사용하였다.

## 2. 시험물질 제조

본 연구에서는 생담반을 가열하여 수분을 증발시킨 고담반(IS3), 고담반을 난백과 혼합시킨 난담반(고담반 : 난백 = 30 : 13)(이하 IS4), 그리고 생담반(이하 IS5)을 사용하였다. IS는 InSan의 이니셜로 담반의 법제법을 제안한 고인산 김일훈 선생의 호로부터 명명되었다.

시험물질(IS3, IS4, IS5) 100mg을 deionized water에 총 양을 1ml로 하여 녹이고, 시험물질이 다 녹은 뒤에 6,000rpm으로 10분 동안 centrifuge를 하여 상층액을 0.8 $\mu$ m의 syringe filter로 filtering하였다(Table 1).

## 3. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay

MTT실험은 3개 조건으로 나누어 진행하였다. 우선 NCI-H460 세포의 생존율을 측정하는 방법으로, 96well plate에 1 × 10<sup>5</sup>cells/ml의 세포를 100 $\mu$ l씩 파종하여, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 각 well당 시험물질(IS3, IS4, IS5)를 농도별(50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 $\mu$ g/ml)로 24시간 treat를 시행하였다. MTT (thiazolyl blue, SIGMA Co.)를 2mg/ml의 농도로 준비하여 15 $\mu$ l씩 첨가하여 3시간동안 반응을 시켰다. 각 well당 시험물질을 제거하고 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 150 $\mu$ l 첨가하여 microplate mixer상에서 10분간 잘 혼합하여 침전물을 용해시킨 후 micro-plate reader에서 540nm 흡광도로 OD (optical density)값을 측정하였다. 2차 MTT로는 IS4에 포함된 난백의 효과를 확인하기 위해 IS4, CuSo<sub>4</sub>, 유정란, 무정란을 50 $\mu$ g/ml으로 48, 96시간 treat를 시행하였으며, IS3, PEG, egg albumin, BSA도 50 $\mu$ g/ml으로 48, 96시간 treat를 시행하였다. 모든 시험결과를 세포를 배양하지 않은 well에서 측정된 흡광도에 대하여 보정한 값을 산출하였다.

## 4. DAPI staining for detection of apoptotic cell

8well chamber slide에 1 × 10<sup>5</sup>cell/ml의 세포를 각 400 $\mu$ l씩 넣고 24시간동안 배양한 후 시료를 처리 후 24시간동안 반응시킨 뒤 반응이 끝나면 배지를 버리고 75mM KCl을 500 $\mu$ l 정도 넣고 5분간 반응을 하였다. 이는 세포를 부풀려서 핵의 관찰을 용이하게 하기 위함이다. 그 다음 acetic acid와 methanol을 1:3으로 섞어 cold-ice 상태를 만든 뒤 이를 500 $\mu$ l 정도 넣어서 5분간 반응시켜 세포를 고정시켰다. 두 번 반복을 시행하였다. 고정이 끝나면 공기 중에서 완전히 말린 뒤 DAPI staining 용액을 100 $\mu$ l 정도 떨어뜨려 10분간 염색한 뒤 PBS로 세척하였다. Glycerol로 cover glass를 덮고 형광현미경으로( $\times$  100 또는  $\times$  200) 관찰하였다. 300개의 세포를 세어 이중 핵의 단편화와 염색질의 응축을 보이는 세포를 apoptosis의 형태적 판정기준에 따라 판독하여 관찰하였다.

## 5. Western blot analysis

원하는 물질의 처리가 끝나면 scraper로 세포를 모으고 모은 세포를 담겨있던 배지와 함께 1000rpm에서 원심분리 하여 상층액을 버린 뒤 2ml의 cold PBS로 두 번 세척하였다. 여기에 50mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 0.02% Sodium Azide, 0.2% SDS, PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) 100 $\mu$ g/ml, Aprotinin 50 $\mu$ l/ml, Igapel 630 (또는 NP-40) 1%, NaF 100 mM, Sodium Deoxychoate 0.5%, EDTA (Ethylendiamine-tetraacetic acid--Sigma E-4884) 0.5 mM, EGTA (Ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyleth-er) N,N,N',N'-tetraacetic acid--sigma E-4378) 0.1mM로 조성된 Lysis Buffer를 50~100 $\mu$ l를 가해 잘 vortex한 뒤 2시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 용해하였다. 반응이 끝나면 시료를 1.5ml tube에 담아 30 초 동안 vortex 하고 4 $^{\circ}$ C 23,000g에서 1시간동안 원심분리 하였다. 원심분리 한 상층액만 취한다. 최종추출물의 단백질량은 Bio-rad protein assay kit를 사용하여 측정한다. 정량이 된 단백질에 Lysis Buffer와 5X sample buffer를 섞어 protein 양을 같게 한 후 100 $^{\circ}$ C heat block에서 5분 동안 boiling 한 후, 잠깐 동안 원심분리 하여 시료를 모은다. Separating gel (12.5%)과 Stacking gel (5%)을 만든 다음, 전기영동을 하고 transfer하였다. transfer가 끝난 gel은 staining solution (Coomassie Blue staining soln.) 용액에 10분 담가둔 후 탈 염색 용액으로 넘겨 남은 protein을 확인하였고,

transfer된 membrane은 TBS-T용액으로 washing한 후 약간 물기를 제거하고 TBS-T 용액으로 희석한 약 5% skim milk로 약 2시간정도 blocking한 후 TBS-T 용액으로 여러 번 세척한다. 1차 항체 (Bax, Bcl-2, Cleaved caspase-3 ; cellsignaling) 및 2차 항체(Anti-Rabbit)와 반응시킨 후 ECL 용액에 1분 정도 반응시킨 후 필름을 카세트에 올려놓고 찍은 다음 현상하여 관찰하였다.

## 6. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE)

일차 Isoelectric focusing (IEF)을 위하여 0.15mg의 단백질 샘플을 13cm immobilized (pH 3-10) nonlinear gradient strips (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)에 적용시켜 상온에서 IEF를 시행하였다. IEF 조건은 Rehydration 12시간 후에 50V에서 8,000V까지 도달하는데 8시간이 걸리게 하였으며, 이후 8,000V에서 1시간 동안 수행하였다. 2-DE는 12% polyacrylamide gels (chemicals from Serva, Heidelberg, Germany and Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하였으며, Colloidal Coomassie Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 24시간 동안 염색한 후 deionized water를 이용하여 염색을 제거하였다.

염색된 이차원 젤은 스캔하여 컴퓨터에 저장하였으며, 질량 분석을 위한 소프트웨어는 Melanie 4 software (Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland)가 사용되었다.

## 7. MALDI-TOF/TOF

발현된 단백질들은 matrix assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF)를 통하여 분석되었다. MALDI-MS 분석을 위하여 젤 spot을 추출하여 50% acetonitrile/25mM Ammonium Bicarbonate를 이용하여 3회 세척 후 100% ACN으로 1회 세척하여 건조시켰다. 건조된 젤 조각은 50 ng trypsin (Promega, Madison, WI)을 함유한 3nmol/l Tris-HCL (pH 8.8)를 이용하여 reswelling하고 15분 후에 3 $\mu$ l의 물을 추가하였다. 제조된 시료 1 microliter를 건조된 매트릭스 스팟에 적하하였다. 매트릭스는 20mg a-Cyano-4-hydroxycinnamic acid

(Sigma)가 1ml 50% acetonitrile, 0.1% TFA in deionized water에 녹여져 있는 성분으로 구성되어 있다.

MALDI-MS 분석은 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)을 이용하여 행해졌으며 Swiss-Prot database를 사용하여 단백질을 검색하였다.

## III. 결과

### 1. 암세포 증식 억제 효과 (MTT assay)

시험 물질의 폐암세포 증식 억제효과를 알아보기 위하여 NCI-H460에 시험물질의 농도를 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 $\mu$ g/ml의 5개 농도로 암세포에 처리하여 암세포의 증식억제효과를 확인하였다. 특히 IS4 (난담반)를 처리하였을 때 암세포의 증식을 가장 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다 (Fig. 1).

### 2. DAPI형광염색을 이용한 apoptosis확인

Apoptosis는 예정 세포 사멸 (programmed cell death)로서 세포의 위축(shrinkage), 염색질 응축, DNA 분절, 미토콘드리아의 기능 장애, caspase protease 활성화 등의 특징을 수반하는 것으로 보고 된 바 있다. DAPI는 청색의 형광 염료로서, DNA의 AT cluster가 있는 minor groove에 결합하여 형광이 증가하는 물질인데, 이러한 특성에 따라, 분절되고 응축된 apoptotic body를 현미경을 통해서 간단히 확인 하여 DNA fragmentation 정도를 육안으로 관찰할 수 있다. 50 $\mu$ g/ml의 농도로 IS4를 처리한 H460 세포에 DAPI stain을 실시하였는데, 대조군과 대비했을 때, 모두 핵의 분절과 염색질의 응축을 관찰할 수 있었으며, 특히 IS4 그룹에서는 많은 apoptotic body를 관찰 할 수 있었다(Fig. 2).

### 3. IS4, CuSO<sub>4</sub>, 유정란, 무정란의 effect에 의한 NCI-H460 인체 폐암 세포주에 독성 효과

IS4에 의한 세포 독성과 그 유효성분의 유정란, 무정란,

CuSO<sub>4</sub>의 연관성을 알아보기 위한 MTT 실험을 진행하였다. 유정란, 무정란에 의한 유의한 effect는 발견되지 않았으며 IS4의 주된 효능은 CuSO<sub>4</sub> 때문인 것으로 추정된다(Fig. 3).

#### 4. Western blot을 이용한 apoptosis관련 단백질 발현 확인 (Bcl-2, Bax, Cleaved caspase-3).

NCI-H460세포에서 IS4를 처리로 인하여, Cleaved caspase-3의 발현은 25 $\mu$ g/ml, 50 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 200 $\mu$ g/ml에서 증가하는 경향을 보였으나, 100 $\mu$ g, 200 $\mu$ g에서는 약간의 감소하는 경향을 보였다. 이는 너무 높은 농도의 시료가 처리가 되어서 독성을 나타낸 것으로 생각된다. IS4를 처리한 군에서 bcl-2의 발현이 약간 증가하였으며, bax의 발현은 감소하였다(Fig. 4).

#### 5. 2-DE에 의한 이미지 분석

IS4의 세포 독성 효과가 어떠한 molecules에 작용하고 있는지 확인하기 위하여 2-DE를 진행하여 이미지를 분석하였다(Fig. 5). NCI-H460 cell line에 아무런 처리를 하지 않은 대조군, IS4 50 $\mu$ g/ml를 처리한 후 24시간이 경과된 실험군을 비교하였으며, 대조군과 시험군 시료의 2-DE 실험을 통하여 얻은 이미지를 분석하여 변화가 있는 spot들을 발견하였다. 이 spot들을 추출하여 MALDI-TOF/TOF 분석을 시행하였다. 그 결과 Table 2.와 같은 단백질들이 분석되었다. 다양한 단백질의 변화가 발견되었는데, 특히 많은 변화를 일으킨 단백질로는 Vimentin은 24시간 후 실험군에서 감소하였으며, Lamin-A/C는 증가하였음을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

### IV. 고찰

난담반은 항암효능이 있다고 추정되는 광물성 한약재 담반을 열처리한 고담반을 난백과 결합하는 방식으로 만든 물질이다. 고 인산 김일훈 선생(1909-1992)은 항암치료 목적으로 1950년대부터 황산염기를 가진 광물성 한약재를 난백으로 혼합하여 사용해왔는데<sup>11)</sup>, 담반을 구워 탈수시킨 고담반을 난백과 혼합한 난담반을 임상에서 사

용할 때는 난담반 만을 단독으로 사용하지 않고 난담반 : 죽염(NaCl 혼합물) 혼합비율을 1:5-30으로 사용한다고 하였으며 이는 죽염이 난담반의 유효성분이 생체 내에서 효과적으로 작용되도록 돕기 때문일 것으로 추측되어진다. 중국 평읍태봉한약재진출구유한공사(平邑泰奉漢藥材進出口有限公司)에서 제공하고 있는 유방암치료방제<sup>13)</sup>에 담반의 용례가 있는데 그 담반이 돼지쓸개즙과 백반의 혼합물인 담반(膽礬)을 지칭하는 것인지 실제 천연광물인 담반을 지칭하는 것인지에 대해서는 확인되지 않았다. 난백은 Lysozyme을 함유하고 있으며 Lysozyme은 대부분의 Gram 양성균에 항균효과를 나타낸다고 보고되어 있고 충치균에 대해서 난백의 Lysozyme 추출물이 억제 효과 있다는 연구결과를 참고하면<sup>14)</sup> 담반과 난백의 결합물에서 종양 치료 가능성을 볼 수 있게 한다. 이처럼 난담반이 암세포에 유효한 항암 효과가 있는 것으로 보고된 바, 이번 연구는 인간 폐암세포 NCI-H460에 대한 난담반의 성장억제효과와 분자생물학적 메커니즘을 밝히기 위해 실시하였다.

Apoptosis는 예정 세포 사멸 (programmed cell death)로서 세포의 위축, 염색질 응축, DNA 분절, 미토콘드리아의 기능 장애, caspase protease 활성화 등의 특징을 수반하는 것으로 보고된 바 있다<sup>15)</sup>. DAPI는 청색의 형광 염료로서, DNA의 AT cluster가 있는 minor groove에 결합하여 형광이 증가하는 물질인데<sup>16)</sup> 이러한 특성에 따라, 분절되고 응축된 apoptotic body를 현미경을 통해서 간단히 확인 하여 DNA fragmentation 정도를 육안으로 관찰할 수 있다. 본 연구에서는 NCI-H460 세포에 DAPI stain을 실시하였는데, 대조군과 대비했을 때, 핵의 분절과 염색질의 응축을 관찰 할 수 있었으며, 고농도로 갈수록 많은 apoptotic body를 관찰 할 수 있었다. 이와 같은 결과로 미루어 보아, IS4의 시료는 NCI-H460에 apoptosis 유도를 하는 것으로 생각된다. DAPI염색을 통해 apoptotic body가 많이 일어난 NCI-H460 cell에 처리하여 apoptosis 관련 단백질인 bcl-2, bax, cleaved caspase-3의 발현 정도를 western blot을 이용하여 확인하였다. bcl-2 family는 세포 밖이나 세포 내의 상황을 전달받는 중요한 신호 전달 체계로서 작용을 하며, bcl-2 단백질은 미토콘드리아 세포막의 안정성을 조절하는 것으로 알려져 있다<sup>17)</sup>. bax는 cytosol에서 미토콘드리아로 이동하면서 미토콘드리아로부터 cytochrome C의 분비를 촉진하여 결국은 세포 사멸을 유도하는 기능을 가지고 있는 반면에 bcl-2는 미토콘드리아로의

bax의 이동을 억제함으로써 세포사멸을 억제시키는 작용을 한다<sup>18,19</sup>. 따라서 bcl-2 수준의 감소는 bax의 이동을 촉진시킴으로써 cytochrome C의 분비를 촉진하는 것으로 알려져 있으며<sup>20</sup>, 이 둘 간의 균형이 세포사멸을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고된 바 있다<sup>21</sup>. Caspase라 이름 붙여진 ICE/CED-like protease family는 apoptosis 유발 경로에 중요한 조절인자로 작용할 수 있는 것으로 보고되어져 오고 있다<sup>22,23</sup>. 이들 family에 속하는 많은 단백질들은 세포에서 핵과 미토콘드리아의 외막에 존재하며<sup>24,25</sup>, 이들의 활성화는 bcl-2/bax family 발현의 정도에 의존적인 경우도 있다<sup>26</sup>. Caspase는 잠재적인 전구체며 procaspase로써 합성되고, 세포사멸 동안 caspase의 aspartic acid기에서 일어나는 단백 용해과정을 통해 활성 단백 분해 효소로 전환된다. caspase는 주로 연쇄적(cascade)으로 작용하며, 상류 caspase가 caspase adaptor와의 상호작용으로 활성화되는 과정이 세포사멸에 있어서 중요한 조절단계로서 세포사멸 촉진 혹은 항 세포사멸 단백 모두에 의하여 조절된다. 활성화된 초기의 caspase 2, 8 혹은 9는 caspase 3, 6 혹은 7에 작용하여 이들을 활성화시키고, 활성화된 이들 caspase들이 다양한 세포단백의 분열을 통해 세포 사멸에 이르게 한다<sup>27</sup>. Caspase-3는 apoptosis로 이르게 하는 중요한 upstream 인자로서 정상적으로 그것은 불활성화된 proenzyme(procaspase-3)의 형태로 존재하다가 가수 분해 되어 두 개의 조각으로 분해되면서 활성화 형태를 갖게 된다<sup>20,28</sup>. Caspase-3는 세포사멸의 초기 단계에 작용하며, 35kDa 효소전구체(proenzyme)의 분리에 의해 유도된 17 및 19 kDa 이중이합체(heterodimer)가 활성화된 형태로<sup>29</sup> caspase-8과 caspase-9의 초기 신호를 증폭시킨다<sup>30</sup>. 한편, 세포사멸은 외인적 및 내인적 경로로 나뉘어 지며, 두 경우 모두 caspase-3의 활성화를 통해 세포사멸을 유발하고<sup>23,30</sup>, 따라서 caspase-3는 세포사멸에 가장 직접적으로 관련된 caspase이다<sup>31</sup>. Caspase-3가 활성화된 형태로 관찰되려면 불활성 형태인 35kDa의 procaspase-3가 상대적으로 발현이 줄어들거나 그들의 활성형인 17kDa과 19kDa 분자량의 단백질이 검출되어야 한다<sup>32,33</sup>. Cleaved caspase-3의 발현은 IS4에서 농도 의존적으로 발현이 증가하였다. 이는 두 암세포 모두 apoptosis에 의한 사멸이 유도되었다는 것을 의미한다. 하지만 bcl-2/bax의 발현은 조금 다른 양상을 나타낸다. IS4를 처리한 군에서 bcl-2의 발현이 약간 증가하였으며, bax의 발현은 감소하였다. 일반적으로 Apoptosis가

일어나게 되면 bcl-2의 발현이 농도가 증가함에 따라 감소하고, bax의 발현은 농도가 증가함에 따라 증가한다. 결과적으로 apoptosis가 발생하게 되면 bcl-2의 발현은 감소하고, bax의 발현을 증가시켜 caspase-3에 의한 apoptosis를 유발함으로써 암세포의 사멸을 가져오는 것이나, IS4의 경우에 있어서는 caspase-3의 발현은 확인하였으나 bcl-2/bax 단백질의 영향을 받는 것이 아니고 다른 경로를 통하여 apoptosis를 유발하는 것으로 사료되어진다.

다음으로는, 난담반이 NCI-H460의 성장을 억제하는 메커니즘에 대해 보다 자세히 알아보기 위하여 프로테오믹스를 이용한 연구를 진행하였다. 프로테오믹스는 프로테인(protein:단백질)과 옴(ome:전체)의 합성어로, 생명체의 유전자인 게놈의 명령으로 만들어진 단백질의 총집합체를 일컫는다. 인간의 유전체 염기서열은 human genome project에 의하여 다 밝혀졌지만, 그것으로는 유전자 산물의 기능을 알 수 없었다. 이는 유전자의 기능이 세포 내에서 얼마나 정교하고 적절하게 단백질이 합성되고 변형되는가에 달려있기 때문이었다. 즉 최종적으로 완벽한 모양이 갖추어진 단백질을 분석해야 그 유전자의 세포 내 기능을 알 수 있는 것이다. 그러므로 단백질의 특성을 총체적으로 분석하는 방법인 프로테오믹스 연구는 생명현상의 원리에 대한 통찰을 가능하게 하며, 이를 이용한 질환 관련 단백질의 동정과 기능의 규명은 의료 및 보건 시스템에서도 활용도와 중요도가 높아지고 있다. 우리는 IS4를 50 $\mu$ g/ml의 농도로 NCI-H460에 처리하여 24시간 후의 단백질 변화를 2-DE 이미지 분석을 통해 확인하였다. 2-DE는 1차 IEF를 통하여 같은 등전점을 가지는 단백질들을 분류하고, 두 번째로 분자량에 따라 분리함으로써 전체 단백질의 변화를 한 번에 비교하고 차이가 나는 단백질이 무엇인지를 알 수 있는 방법이다. 대조군과 IS4 처리 후 24시간에 보인 spot을 찾아 MALDI-MS/MS로 확인하여 발현에 차이를 보이는 단백질을 동정할 수 있었다. 이 중 가장 큰 변화를 보이는 단백질은 vimentin이었다. Vimentin은 세포질 내에 존재하는 중간 단섬유(intermediate filaments)로 세포의 골격(cytoskeleton) 형성에 있어서 중요한 역할을 하며<sup>34</sup>, 흑색종과 슈반세포종과 같은 간엽세포기원의 세포에서 강한 반응을 보이며 갑상선의 육종이나 림프종에서도 발현된다<sup>35</sup>. Vimentin은 cell elongation, attachment 뿐만 아니라 plasma membrane에서 핵 내부로의 신호전달에도 중요한 역할을 하고 있으며<sup>36</sup>, 과발현된 vimentin은

암의 침투 및 전이와도 연관이 되어있다<sup>37)</sup>. NCI-H460에 IS4를 처리하면 vimentin의 발현이 현저히 감소하는 것을 토대로 IS4의 항암효과를 예측해볼 수 있다. 이러한 실험 결과를 토대로 앞으로의 연구는 molecular level에서 IS4의 항암효과를 이해하는 것을 기초로, 치료적 가치를 가지는 단백질 조절을 밝힌 후 다양한 cancer survival factors를 관찰, 추적하는 진일보한 기전연구 및 동물실험에 초점이 맞춰져야 할 것으로 사료되는 바이다. 본 담반의 연구를 통해 향후 광물성 한약재에 대한 연구가 더 활발해지기를 기대하는 바이다.

### V. 결론

본 연구에서는 담반을 가열하여 수분을 증발시킨 고담반(IS3), 고담반을 난백과 혼합시킨 난담반(IS4), 그리고 생담반(IS5)의 NCI-H460 인체폐암세포에 대한 세포독성을 비교 확인하고, 이중 가장 효능이 뛰어난 난담반에 대한 기전탐색 실험을 진행하였다.

1. NCI-H460 폐암세포에 IS3, IS4, IS5 3가지 시료를 처리한 결과 IS4가 암세포의 증식을 가장 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다.

2. IS3, IS4, IS5를 50 $\mu$ g/ml 농도로 DAPI stain을 실시한 결과 대조군과 대비했을 때, 모두 핵의 분절과 염색질의 응축을 관찰 할 수 있었으며, 특히 IS4 그룹에서 많은 apoptotic body를 관찰 할 수 있었다.

3. NCI-H460 폐암세포에 IS4, 유정란, 무정란, CuSO<sub>4</sub>를 50 $\mu$ g/ml으로 처리한 결과, IS4의 세포독성은 CuSO<sub>4</sub>에 의한 것으로 추정되었다.

4. Cleaved caspase-3의 발현은 IS4에서 농도 의존적으로 발현이 증가된 반면 Bcl-2의 발현은 증가하고 Bax의 발현은 감소하였다.

5. IS4는 Vimentin, Lamin-A/C 와 같은 단백질의 발현을 조절함을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 난담반은 caspase-3의 활성화에 의해 세포사멸을 유도하여 인간폐암세포주의 성장을 억제하였

으며 NCI-H460에서의 단백질 발현 조절 등을 통해 항암효과를 나타내는 것을 알 수 있었다. 향후 진일보한 기전연구가 필요할 것으로 사료된다.

### VI. 참고문헌

- 1) Lee KY. Target therapy for Lung Cancer. J Korean Med Assoc. 2008;51(5):483-491.
- 2) Park SC, Yoo HS, Cho CK, Lee YW. Recent Experimental Tendency for Herbal Medicines Treating Lung Cancer in South Korea. J of Kor. Traditional Oncology. 2008;13(1):43-54.
- 3) Koo JK, Kim SH, Kim BT. Experimental study on Antitumor Activity of Pyungsodank-akambang. 1997;11(1):49-57.
- 4) Heo S. Ku BS. A Study on the mineral of substance used in mental disease. J. of Oriental Neuropsychiatry. 1999;10(11):159-177.
- 5) Hong MH. Mineral Oriental Medicine in Korea (1). Kor. J. of Pharmacognosy. 1973;4(3):105-152.
- 6) Seo BI, Byun JS. A study on Using of Mineral Oriental Medicine. J. of East-West Med. 1998;23(3):1-5.
- 7) Lee JC. Park MU. Oriental Medical Mineralogy. Uisung Pub. 2005;57,437-438
- 8) Park MU. The stone stry by Prof. Park. SanJi-Ni Pub. 2008;122,191,438
- 9) Han SH. Molecular Biological Advances in Human Copper Metabolism: Molecular Genetics in Wilson`s Disease. J. of Kor. Asso. for the Study of the Liver. 1998;4(3):223-234.
- 10) Han IK, Kin SG, Go YK, Ha JK. Nutrition and Feed Resources : Effects of Copper and Sulfur Sources on the Performance of Broiler Chicks. Kor. J. Ani. Sci. 1985;27(10):651-654.
- 11) Kim IH. Cosmos and New Drug. Dong-Mun Pub. 1980;145.
- 12) Jia Kun. Research for Cancer Prevention about Traditional Chinese Medicine. Xiaksi Sci. Pub.

- 1982;17.
- 13) <http://kangtai-2000.diytrade.com>
- 14) Choi HD. Functional Properties of Phosvitin and Lysozyme as Food Material. *Administry of Food and Agriculture & Forestry*. 2002;90-92.
- 15) Rashmi, Santhosh Kumar TR, Karunagaran D. Human colon cancer cells differ in their sensitivity to curcumin-induced apoptosis and heat shock protects them by inhibiting the release of apoptosis-including factor and caspases. *FEBS Lett*. 2003;538(1-3):19-24.
- 16) Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. *Biotech Histochem*. 1995;70(5):220-233.
- 17) Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998;281(5381):1322-1326.
- 18) Nomura M, Shimizu S, Ito T, Narita M, Matsuda H, Tsujimoto Y. Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by Bcl-2. *Cancer Res*. 1999;59(21):5542-5548.
- 19) Murphy KM, Streips UN, Lock RB. Bcl-2 inhibits a Fas-induced conformational change in the Bax N terminus and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem*. 2000;275(23):17225-17228.
- 20) Choi OS, Kim WY. Effects of curcumin on apoptosis in SW 480 human colon cancer cell line. *Korean J Nutr*. 2004;37(1):31-37.
- 21) Zhao ZQ, Budde JM, Morris C, Wang NP, Velez DA, Muraki S, Guyton RA, Vinten JJ. Adenosine attenuated reperfusion induced apoptotic cell death by modulation expression of Bcl-2 and Bax proteins. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:57-68.
- 22) Evans VG. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol Int*. 1993;17:461-476.
- 23) Nagata S. Apoptosis by Death Factor. *Cell*. 1997;88:355-365.
- 24) Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family protein in apoptosis apoptosomes or mitochondria *Genes Cells*. 1998;3:697-707.
- 25) Reed JC. Apoptosis and cancer: Strategies for integrating programmed cell death. *Seminars in Hematology*. 2000;37:9-16.
- 26) Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997;275:1132-1136.
- 27) Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: Functions and regulations of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64:821-846.
- 28) Ko JH, Lee SJ, Lim KT. 116 kDa glycoprotein isolated from *Ulmus davidiana* Nakai (UDN) inhibits glucose/glucose oxidase (G/GO)-induced apoptosis in BNL CL.2 cells. *J Ethnopharmacol*. 2005;100(3):339-346.
- 29) Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem*. 1994;269:30761-30764.
- 30) Grüter MG. Caspases: Key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol*. 2000;10:649-655.
- 31) Lee GY, Kim MH, Choi HY, Myung KB. Preliminary study of expression of caspase mRNA and apoptosis in squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. *Kor J Dermatol*. 2003;41(1):7-14.
- 32) Kang YK, Park DI, Lee JH, Choi YH. The effects of Yunpyesan on cell proliferation, apoptosis and cell cycle progression of human lung cancer A549 cells. *Kor J Oriental & Pathology*. 2002;16(4):745-755.
- 33) Ahn WS, Bae SM, Lee JM, Namkoong SE, Han SJ, Cho YL, Nam GH, Seo JS, Kim CK, Kim YW. Searching for pathogenic gene functions to cervical cancer. *Gynecologic*



Oncology. 2004;93:41-48.

- 34) Lazarides E. Intermediate filaments: a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. *Annu Rev Biochem.* 1982;51:219-250.
- 35) Miettinen M, Freyssila K, Letho VP, Paasivuo R, Virtanen I. Expression of intermediate filament proteins in thyroid gland and thyroid tumors. *Lab Invest.* 1984;50:262-270.

- 36) Owen PJ, Johnson GD, Lord JM. Protein kinase C-delta associates with vimentin intermediate filaments in differentiated HL60 cells. *Exp Cell Res.* 1996;225(2):366-373.
- 37) Gilles C, Polette M, Piette J, Delvigne AC, Thompson EW, Foidart JM, Birembaut P. Vimentin expression in cervical carcinomas: association with invasive and migratory potential. *J Pathol.* 1996;180(2):175-180.

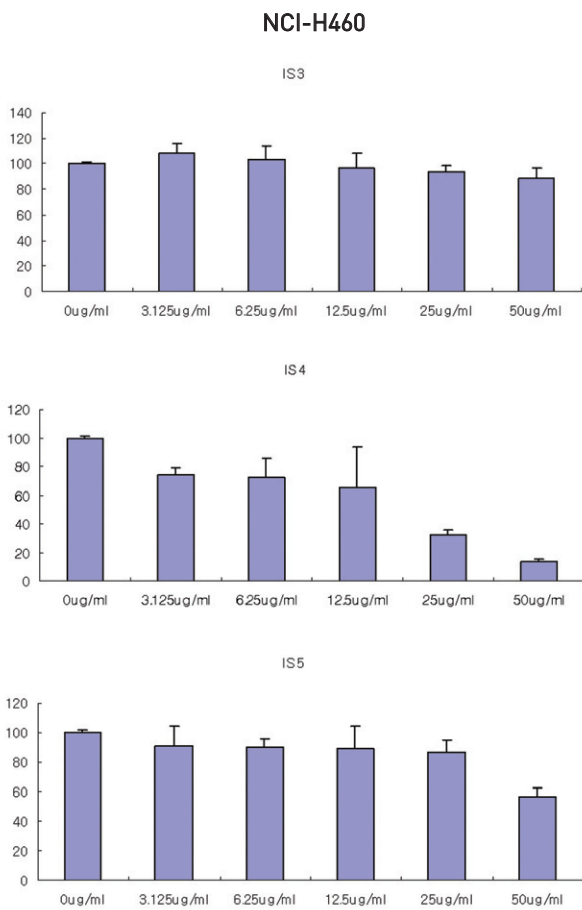


Fig. 1. Inhibitory effects of sample on the growth of NCI-H460 cancer cells. Cancer cells were treated different concentrations [0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 µg/ml] of sample at 37°C for 24 h and inhibitory effects were estimated by the MTT-assay. Each bar represents the mean ± SD. [IS3, Chalcantithite (CuSO<sub>4</sub>); IS4, Egg white combined-Chalcantithite; IS5, Chalcantithite (CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O)]

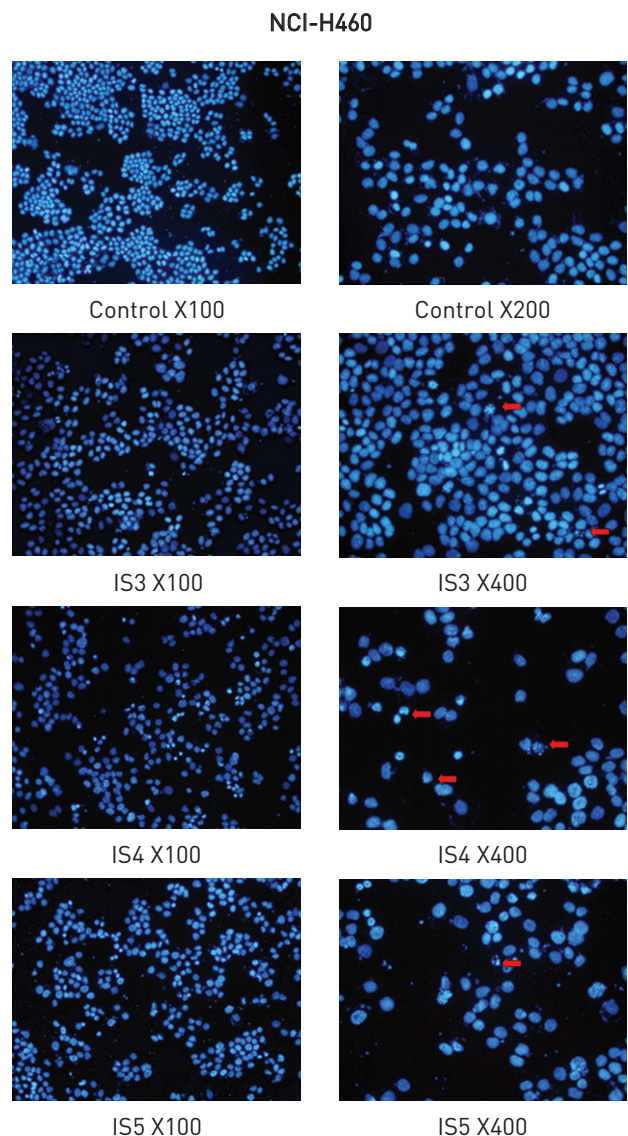
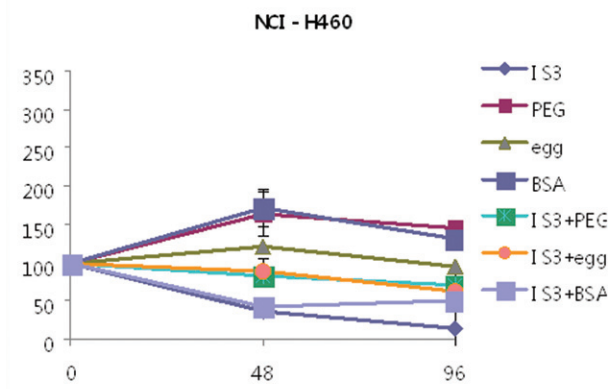
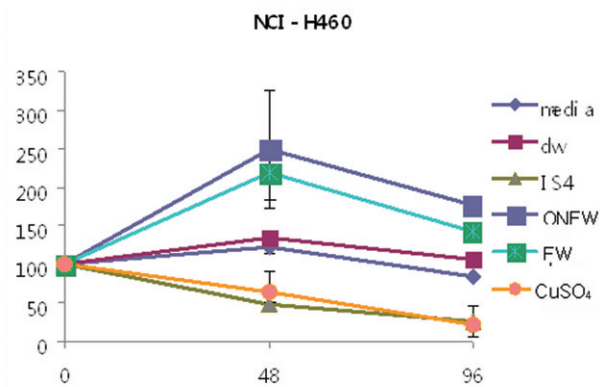


Fig. 2. Morphological aspect of control and treated NCI-H460 cells with sample (50 µg/ml) by DAPI stain. Cancer cells were stained with DAPI and showed condensed and fragmented nuclei, which are hallmarks of the apoptotic nuclei. [IS3, Chalcantithite (CuSO<sub>4</sub>); IS4, Egg white combined-Chalcantithite; IS5, Chalcantithite (CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O)]



PEG = Polyethylene glycol  
BSA = Bovine serum albumin



DW = Dextrose water  
ONEW = Organic natural egg white  
EW = Egg white

Fig. 3. Inhibitory effects of IS3 and IS4 samples on the growth of NCI-H460 cancer cells. Cancer cells were treated different samples (IS4, CuSO<sub>4</sub>, IS3, PEG, egg albumin, BSA; 50 μg/ml) at 37°C for 48h, 96h and inhibitory effects were estimated by the MTT-assay. Each bar represents the mean ± SD. (IS3, Chalcanthite (CuSO<sub>4</sub>); IS4, Egg white combined-Chalcanthite)

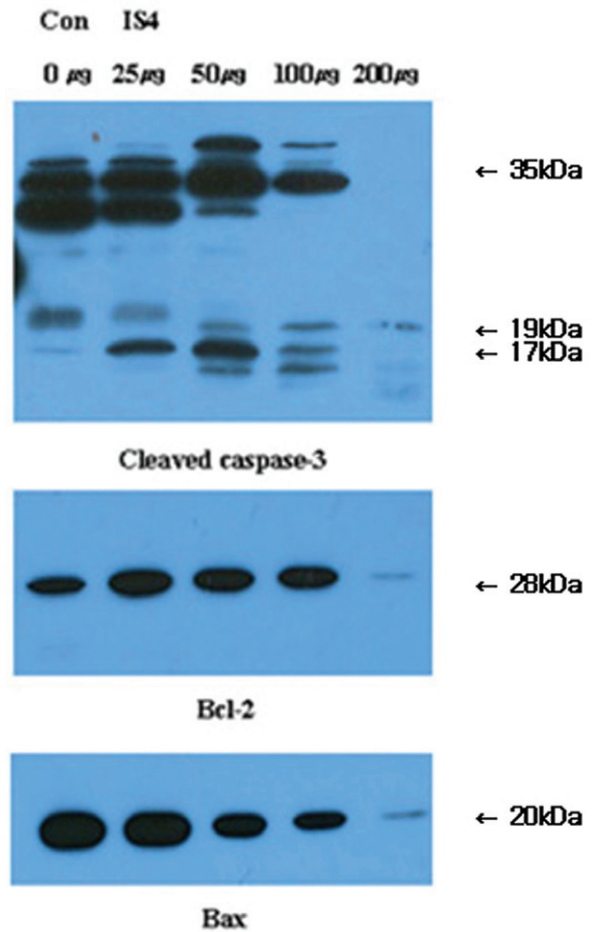


Fig. 4. Effects of IS4 on expression of apoptosis regulatory proteins. NCI-H460 lung cancer cells were treated different concentrations (0, 25, 50, 100, 200 μg/ml) of IS4 at 37°C for 24 hr. Equal amounts of the total proteins (50 μg/lane) were subjected to 12.5% SDS-PAGE. The expression of cleaved caspase-3, bcl-2, and bax was detected by western blotting using the specific antibodies. Photographs of chemiluminescent detection of the blots, which were representative of 3 independent experiments, are shown. (IS4, Egg white combined-Chalcanthite)

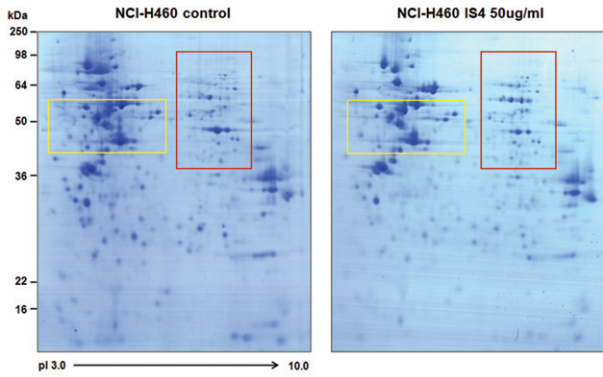


Fig. 5. Image analysis by *Two-dimensional gel electrophoresis*. Various changes of the protein expression in boxes have been monitored. (IS4, Egg white combined-Chalcanthite)

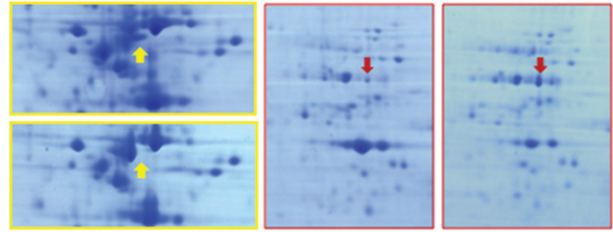


Fig. 6. Comparison of non-treated and 24 h after treatment's expanded image of protein expression in gel. Yellow arrow is Vimentin. Red arrow is Lamin-A/C.

Table 1. Materials

Material	Concentration	Solubility	Filter Size
IS3	100mg/ml	97% (precipitation : 30µg)	0.8µm filter
IS4	100mg/ml	Leave little white powder	0.8µm filter
IS5	100mg/ml	100%	0.8µm filter

IS3 (InSan3) : Chalcanthite (CuSO<sub>4</sub>)

IS4 (InSan4) : Egg white combined-Chalcanthite

IS5 (InSan5) : Chalcanthite (CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O)

Table 2. Changed protein expression in NCI-H460 treated with IS4

No.	Protein Accession No.	Full Name of Prtein (Homo sapiens)	Mr (Da)	pI	MALDI-MS Sequence Coverage(%)
1	Q14140	SERTA domain-containing protein 2	33875	4.42	16%
2	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	70854	5.37	11%
3	p07437	Tubulin beta chain	49639	4.78	9%
4	P08670	Vimentin	53619	5.06	13%
5	P17931	Galectin-3	26172	8.58	35%
6	P06733	Alpha-enolase	47139	7.01	25%
7	P02545	Lamin-A/C	74095	6.57	30%

IS4 (InSan4) : Egg white combined-Chalcanthite